

УДК 57.065:577.29

**МИКРОСПОРИДИЯ *GLUGEA GASTEROSTEI* VORONIN 1974  
(MICROSPORIDIA: MARINOSPORIDIA) ИЗ ТРЕХИГЛОЙ  
КОЛЮШКИ *GASTEROSTEUS ACULEATUS* (ACTINOPTERYGII:  
*GASTEROSTEIFORMES*) КАК САМОСТОЯТЕЛЬНЫЙ ВИД**

© Ю. С. Токарев,<sup>1,\*</sup> В. И. Воронин,<sup>2</sup> И. В. Сендерский,<sup>3</sup> И. В. Исси<sup>3</sup>

<sup>1, 3</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений  
ш. Подбельского, 3, С.-Петербург, Пушкин, 196608

<sup>2</sup> Санкт-Петербургская Академия ветеринарной медицины  
ул. Черниговская, 5, С.-Петербург, 196084

E-mail: \* jumacro@yahoo.com

Поступила 02.02.2015

Микроспоридия *Glugea gasterostei* Voronin 1974 из трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* описана как самостоятельный вид на основании морфологических и экологических особенностей паразита (Воронин, 1974), а также ультраструктурных характеристик его спор (Воронин, 1983). При ревизии микроспоридий рода *Glugea* (Canning, Lom, 1986; Lom, 2002) валидность данного вида была поставлена под сомнение, и он был синонимизирован с *G. anomala*. Тем не менее молекулярно-филогенетический анализ, выполненный в настоящей работе, показал уникальность молекулярного гаплотипа гена малой субъединицы рибосомальной РНК *G. gasterostei* (номер доступа в Генбанке KM977990) и близкое родство данного вида с *G. anomala*, *G. atherinae* и *G. hertwigi* (сходство нуклеотидных последовательностей на уровне 99.7 %). Одним из характерных признаков *G. gasterostei* в отличие от *G. anomala* следует считать образование ксеном на внутренних органах, а не на покровах зараженных рыб, поскольку данное свойство сохраняется при заражении разных видов хозяев. Таким образом, имеются все основания считать *G. gasterostei* самостоятельным видом среди близкородственных таксонов, дивергировавших относительно недавно.

**Ключевые слова:** микроспоридии, филогения, видообразование, таксономия, рибосомальная РНК.

**ВВЕДЕНИЕ**

Система микроспоридий, одних из самых мелких одноклеточных эукариот, на протяжении последних пятидесяти лет подвергается непрерывным изменениям и все еще находится в процессе своего осмысления и постепенного формирования. Совершенствование методов исследований микроспоридий, облигатных внутриклеточных паразитов многих животных, привело к резкому увеличению числа описанных форм, а разные

подходы к систематизации видов — к разработке различающихся между собой систем. Начатые в 1960-х годах электронно-микроскопические исследования стадий развития микроспоридий выявили богатый набор ультраструктурных характеристик, которым авторами разных систем придавался разный таксономический уровень. Последовавшее с конца 1980-х годов изучение этих паразитов молекулярно-биологическими методами практически привело к полному отрицанию систем, построенных на ультраструктурных признаках, так как секвенирование консервативных участков генов разъединило многие виды, ранее считавшиеся родственными, или выявило близкое родство форм, далеко отстоящих в старых системах.

Ситуация с видом *G. gasterostei* отражает современное положение в систематике микроспоридий. В 1974 г. при исследовании на зараженность трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. найдена микроспоридия, описанная как новый вид на основании морфологических признаков (форма спор и их размерные характеристики) и гистотропии паразита (висцеральный листок мезентерия), четко отличающих ее от уже давно известного для этой рыбы паразита, микроспоридии *G. anomala* (Воронин, 1974). В более поздней работе автора отличия нового вида были дополнены ультраструктурными признаками — иным, чем у *G. anomala* числом витков полярной трубки (Воронин, 1983).

Несмотря на эти отличия от *G. anomala*, *G. gasterostei* и ряд микроспоридий из других рыб были включены в группу «видов, возможно идентичных *G. anomala*» (Canning, Lom, 1986). Сходное мнение, что *G. gasterostei* — «возможный синоним» *G. anomala*, послужило основанием для исключения *G. gasterostei* из каталога валидных видов микроспоридий рыб, по версии Лома (Lom, 2002) состоящего из 80 наименований. Серьезных аргументов против подобной точки зрения не удалось получить и после проведения электронно-микроскопических исследований спор *G. gasterostei*, *G. anomala* и *Loma acerinae*, которые показали значительное сходство в их ультратонкой организации при небольших различиях в числе витков полярной трубки (Воронин и др., 1997). В другой работе, но уже по результатам секвенирования рибосомальной ДНК пяти изолятов микроспоридий рыб, исследователи заключили, что *G. anomala*, *G. stephani* и *G. atherinae* фактически представляют один вид рода *Glugea*, а именно *G. anomala* (Pomport-Castillon et al., 2000). В этой ситуации для решения вопроса о валидности *G. gasterostei* в дополнение к ранее полученным данным был проведен молекулярно-филогенетический анализ вида, результаты которого изложены в этой статье.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

С 1972 по 2014 г. включительно на зараженность микроспоридиями исследовано 5047 экз. трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus*. Всех рыб вскрывали для определения экстенсивности и интенсивности заражения, гистотропии паразита и отбора проб для светомикроскопического, гистологического и электронно-микроскопического исследований, проведенных по общепринятым методикам (Воронин, Исси, 1974; Воронин и др., 1997). Ксеномы, использованные для молекулярного анализа, взяты из

рыб из ставных неводов, установленных в Финском заливе возле г. Сестрорецка (60°05' N 29°55' E).

Для выделения геномной ДНК ксеномы со спорами микроспоридий вскрывали пинцетом и гомогенизировали пластиковым пестиком в центрифужной пробирке. Образцы инкубировали в 2%-ном растворе цетилтриметиламмоний бромидом с добавлением 0.2 % бета-меркаптоэтанола в течение 3 ч при 65 °С. Затем добавляли равный объем смеси забуференного Трисом фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1), центрифугировали и переносили верхнюю фазу в новые пробирки. К образцам добавляли равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1), центрифугировали (10 мин, 7000 g) и, вновь перенося в новые пробирки, повторяли процедуру центрифугирования; верхнюю фазу отбирали и смешивали с равным объемом изопропанола. Для преципитации ДНК образцы оставляли на ночь при –20 °С, после чего центрифугировали (30 мин, 14 000 g, +4 °С), изопропанол декантировали, а осадки дважды отмывали 70%-ным этанолом (Sambrook et al., 1989). Отмытые и подсушенные осадки ресуспендировали в ультраочищенной воде. Амплификацию участка ДНК, кодирующего малую субъединицу рибосомальной РНК (мсрРНК), проводили методом стандартной ПЦР с универсальными для микроспоридий праймерами V1f 5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3' (Weiss et al., 1994) и ss1492r 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Weiss, Vossbrinck, 1999) с использованием Colored Taq-полимеразы («Силекс», Москва). ПЦР-продукты разделяли в 1%-ном агарозном геле, полосы размером около 1300 н. о., соответствующие специфическому положительному сигналу, вырезали скальпелем на трансиллюминаторе и замораживали до последующей очистки. Очистку ампликонов проводили методом сорбции ДНК на оксиде кремния после расплавления геля в 6М растворе йодида натрия с последующей отмывкой смесью спиртов на буферном растворе и элюцией в воде (Vogelstein, Gillespie, 1979). Секвенирование проводили по методу Сэнгера на капиллярном секвенаторе ABI Prism 3500. Полученные сиквенсы сравнивали с таковыми, депонированными в Генбанке, с помощью встроенной утилиты BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) по алгоритму megablast, осуществляющему поиск и сравнение сиквенсов, обладающих высоким уровнем сходства. Гомологичные сиквенсы использовали для элайнмента в приложении BioEdit (Hall, 1999), в котором удаляли участки, содержащие инсерции/делеции (indels). Полученный элайнмент, протяженностью 1110 н. о., конвертировали в файл формата NEXUS, на основании которого провели филогенетическое построение методом байесовского заключения в программе MrBayes (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) с применением стандартной модели GTR+I+G по алгоритму MCMC на протяжении 100 000 генераций до достижения показателем average standard deviation of split frequencies значения ниже 0.01.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В 1974 г. из Невской губы Финского залива отловлены и исследованы на зараженность микроспоридиями 350 экз. трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus*. Обнаружено две микроспоридии, один вид отнесен к

*G. anomala* (Moniez, 1887) Gurley, 1893, а второй описан как новый — *G. gasterostei* (Воронин, 1974). Обоснованием для описания *G. gasterostei* в качестве нового вида, отличающегося от *G. anomala*, послужили более вытянутая форма спор с крупной задней вакуолью и более крупные споры. Виды различались между собой гистотропией.

### Распространение и зараженность

Трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* — наиболее многочисленный вид рыб в Невской губе Финского залива. В период с 1972 по 1978 г. общая зараженность рыб *G. gasterostei* составила 1.2 % (51 экз. из 4233 исследованных рыб), а за 1997 и 1998 гг. — 1.6 %. В 2013 г. из 100 колюшек зараженными оказались уже 16 (16 %), а в 2014 г. из 54 рыб — 17 (31.5 %). Значительно увеличилась и интенсивность зараженности, которая в 2014 г. составила в среднем 2.3 ксеномы на рыбу. Таким образом, многолетние исследования свидетельствуют как о постоянном заражении колюшек микроспоридией *G. gasterostei* в Невской губе, так и о значительном возрастании уровня зараженности в последние годы. В отличие от *G. anomala*, вызывающей образование подкожных, внешне хорошо заметных ксеном, все ксеномы *G. gasterostei* располагаются только в брюшной полости и для их обнаружения необходимо вскрытие рыб.

### Гистотропия, морфология, ультраструктура

Микроспоридия *G. gasterostei* образует ксеномы на внутренних органах как при заражении своего типового хозяина, *Gasterosteus aculeatus*, так и при экспериментальном заражении девятииглой колюшки *Pungitius pungitius* (L., 1758). В одной рыбе образуется от одной до нескольких шаровидных ксеном, достигающих максимального размера 5—6 мм. Иногда можно наблюдать образование мелких вторичных ксеном непосредственно на поверхности первичных в результате аутоинфекции, т. е. развития следующего поколения паразитов из спор, образовавшихся в этом же и заразивших этого же хозяина (рис. 1, см. вкл.). Содержимое крупных ксеном представлено исключительно спорами, лежащими преимущественно одиночно, реже парами. Иногда присутствуют их шарообразные скопления, представляющие собой спорофорные пузырьки (рис. 2, см. вкл.). Следует отметить, что по консистенции содержимое ксеном плотное, напоминает творожистую массу в отличие от ксеном со спорами *G. anomala*, содержимое которых имеет сливкообразную консистенцию. Живые споры удлиненно-эллипсоидной формы (рис. 3, а, см. вкл.), размером  $5.8 (4.8—6.0) \times 2.6 (2.1—2.8)$  мкм с индексом (отношение длины к ширине) 2.2. Задняя вакуоль занимает почти половину объема споры. Ультратонкое строение спор типично для представителей рода *Glugea*. Якорный диск небольшой, расположен несколько эксцентрично. Полярный пласт двухчастный, образован передней мелкопластинчатой и компактной частью, которая как бы охватывает заднюю редкопластинчатую часть. В общей сложности полярный пласт занимает около 1/3 объема споры. Полярная трубка изофилярная,

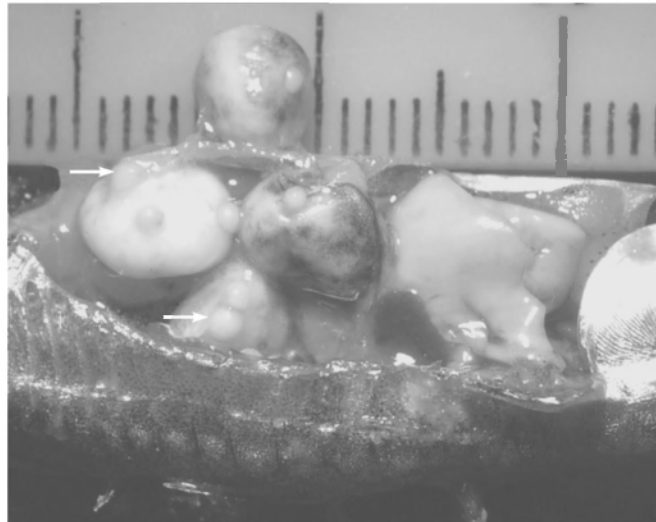


Рис. 1. Внешний вид ксеном *Glugea gasterostei* на внутренних органах колюшки *Gasterosteus aculeatus*.

Стрелками указаны более мелкие вторичные ксеномы, образовавшиеся на поверхности первичных ксеном.

Fig. 1. The appearance of xenomas of *Glugea gasterostei* on the inner tissues of the stickleback *Gasterosteus aculeatus*.

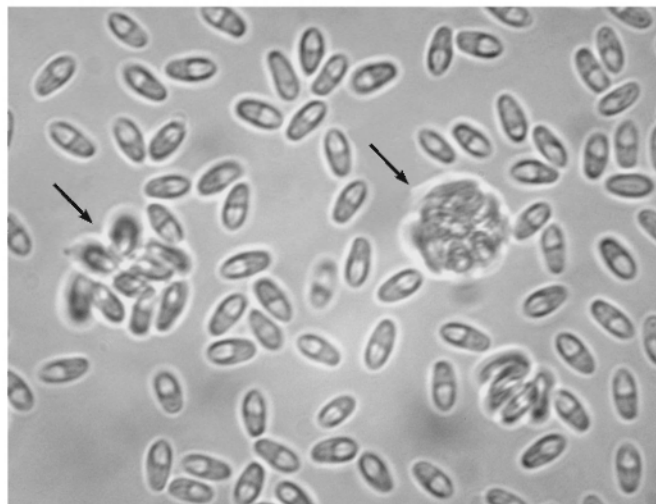


Рис. 2. Спорофорные пузырьки (стрелки) среди одиночных спор *Glugea gasterostei*. Световая микроскопия, светлое поле.

Fig. 2. Sporophorous vesicles (arrows) among single spores of *Glugea gasterostei*. Light microscopy, bright field.

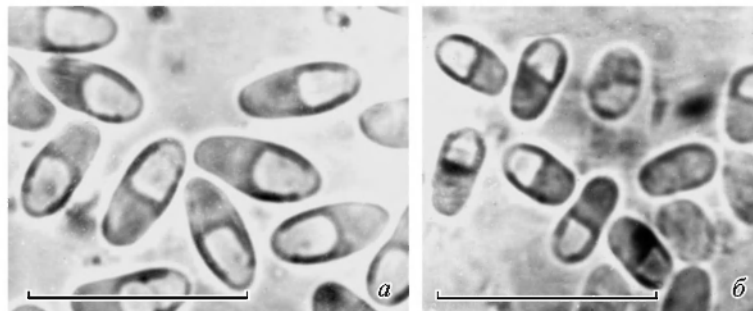


Рис. 3. Споры микроспоридий *Glugea gasterostei* (а) и *G. anomala* (б). Световая микроскопия, светлое поле.

Масштабная линейка — 10 мкм.

Fig. 3. Spores of microsporidia *Glugea gasterostei* (a) and *G. anomala* (b). Light microscopy, bright field.

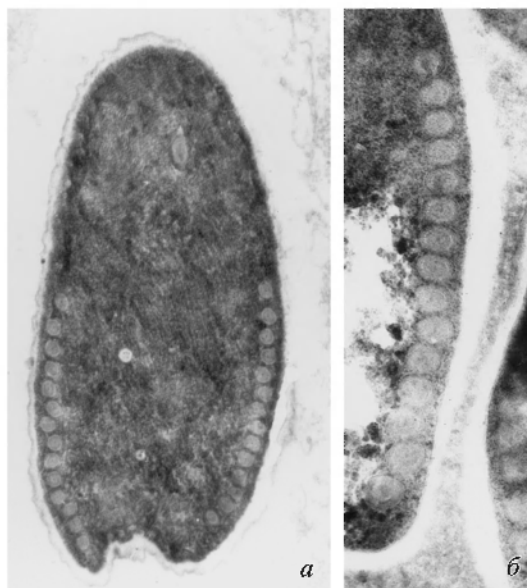


Рис. 4. Ультраструктура споры *Glugea anomala* (а) и фрагмент споры *G. gasterostei*, демонстрирующий витки полярной трубки (б). Трансмиссионная электронная микроскопия.

Fig. 4. Spore ultrastructure of *Glugea anomala* (a) and a fragment of *G. gasterostei* spore, showing polar tube coils (b). Transmission electron microscopy.

делает 15—16 витков, лежащих в один ряд (рис. 4, б, см. вкл.). Эндоспора относительно толстая, толщиной до 30 нм, бесструктурная или мелковолокнистая. Ядро одно, крупное, расположено в центре споры. Задняя вакуоль большая, свободная от включений. Для сравнения споры *G. anomala* овальной формы, размером 4.6 (3.3—5.0) × 2.3 (2.1—2.5) мкм с индексом 2.0 (рис. 3, б), полярная трубка имеет 13—15 витков (рис. 4, а).

### Молекулярная филогения

В результате секвенирования участка гена мсрРНК микроспоридии *G. gasterostei*, изученной в настоящей работе, получена нуклеотидная последовательность протяженностью 1306 нуклеотидов (номер доступа в Генбанке KM977990). Ее сравнение с гомологичными сиквенсами, депонированными в Генбанке, показало максимальное сходство этого вида с группой видов рода *Glugea*. При этом наиболее близкородственными формами, имеющими сходство нуклеотидных последовательностей с *G. gasterostei* и между собой на уровне 99.3—99.7, оказались *G. atherinae* (номер доступа в Генбанке U15987) из обыкновенной атерины *Atherina boyeri*, *G. anomala* (AF056015) из трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus*, *G. stephani* (AF056016) из речной камбалы *Platichthys flesus* и *G. hertwigi* (GQ203287) из американской корюшки *Osmerus mordax*. По причинам, изложенным далее, указанный изолят *G. anomala* можно считать типовым для данного вида. В то же время другие доступные сиквенсы гена мсрРНК, полученные, согласно аннотации, для *G. anomala*, демонстрируют значительно более низкий уровень сходства с гомологичными последовательностями перечисленных таксонов: на уровне 98.2—98.7 % (AF04439) и 93.1—94.7 % (AB923879) (см. таблицу). Такие уровни сходства с типовым образцом *G. anomala* исключают возможность их отнесения к данному виду, свидетельствуя о неопределенности таксономического статуса данных изолятов микроспоридий. Для более корректного представления материала в настоящей работе эти формы указаны под названиями *Glugea* sp. AF04391 и *Glugea* sp. AB923879.

Идентичность сиквенсов *G. anomala* (AF056015) и *G. stephani* (AF056016) указывает на их принадлежность одному виду. Возможны два объяснения данному обстоятельству. Во-первых, изолят *G. anomala*, заразивший речную камбалу, мог быть ошибочно идентифицирован как *G. stephani* в работе по генотипированию этих микроспоридий (Pomport-Castillon et al., 2000), в этом случае *G. stephani* остается видом, валидность которого не верифицирована методами молекулярной филогении. Во-вторых, не исключено, что исходно *G. anomala* из камбалы был описан как *G. stephani*, т. е. изоляты, определяемые как *G. stephani* по признаку заражения различных видов камбалообразных рыб (Olson, 1981), относятся на самом деле к представителям *G. anomala*. На основании имеющихся данных невозможно определить, какое из приведенных объяснений более вероятно.

При филогенетической реконструкции с использованием сиквенсов гена мсрРНК основных таксонов микроспоридий класса *Marinosporidia* все виды рода *Glugea* были расположены в политомическом узле, за исключением *Glugea* sp. AF04391 и *Glugea* sp. AB923879, которые заняли сестрин-

Уровни сходства нуклеотидных последовательностей микроспоридий рода *Glugea* и *Loma acerinae* (внешняя группа), использованных для филогенетического построения в настоящей работе. Полуужирным шрифтом выделен таксон, сиквенс которого получен в настоящей работе. Остальные сиквенсы загружены из Генбанка

Levels of nucleotide sequence similarity of microsporidia of the genus *Glugea* and *Loma acerinae* (an outgroup), used for the phylogenetic reconstruction under the present study. Bold font indicates the sequence obtained in the present study while the others are downloaded from Genbank

Название таксона	Номер доступа в Генбанке	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Glugea anomala</i>	AF056016	ID	—	—	—	—	—	—
2. <i>Glugea</i> sp.	AF044391	98.7	ID	—	—	—	—	—
3. <i>Glugea</i> sp.	AB923879	94.7	93.6	ID	—	—	—	—
4. <i>Glugea atherinae</i>	U15987	98.6	99.5	93.6	ID	—	—	—
5. <i>Glugea hertwigi</i>	GQ203287	98.5	99.4	93.5	99.3	ID	—	—
6. <b><i>Glugea gasterostei</i></b>	KM977990	98.7	99.6	93.6	99.7	99.4	ID	—
7. <i>Glugea plecoglossi</i>	AB623035	98.2	99.1	93.1	99.0	98.9	99.1	ID
8. <i>Loma acerinae</i>	AJ252951	90.6	91.5	86.4	91.5	91.3	91.7	91.2

ское положение по отношению друг к другу на дихотомической ветви, входящей в тот же политомический узел (не показано). Незначительно повысить разрешимость данного политомического узла удалось только выполнив анализ отдельно для семи гаплотипов микроспоридий рода *Glugea* с привлечением в качестве внешней группы *Loma acerinae*. В этом случае вид *G. plecoglossi* занял самое базальное положение по отношению к ближайшим родственникам, однако в остальном топология не изменилась — большинство анализируемых видов сохранили положение в политомическом узле, демонстрируя низкий уровень филогенетического сигнала в анализируемом локусе (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Подавляющее большинство охарактеризованных на молекулярно-генетическом уровне микроспоридий морских и пресноводных рыб относится к одной филогенетической группировке, а именно к классу *Marinosporidia* sensu Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005. В эту группу также входят ряд паразитов ракообразных и насекомых и один возбудитель заболеваний человека — *Trachipleistophora hominis*. Основные таксоны паразитов рыб уровня рода, составляющие данный класс, включают *Glugea*, *Loma*, *Pseudoloma*, *Ichthyosporidium*, *Pleistophora*, *Ovipleistophora*, *Heterosporis*, *Dasyatispora*, *Myosporidium*, составляющие крону данной филогенетической ветви, а также *Tetramicra*, *Microgemma*, *Spraguea* и *Kabatana*, занимающие более базальное положение (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005; Diamant et al., 2010). Важно отметить, что таксономическое положение ряда видов, сиквенсы гена мсрРНК которых депонированы в Генбанке, определено достаточно условно и требует ревизии. Это, в частности, касается родов *Loma* и *Glugea*. Так, к роду *Loma* отнесены две существенно дивергировавшие филогенетические линии, занимающие сестринское положение



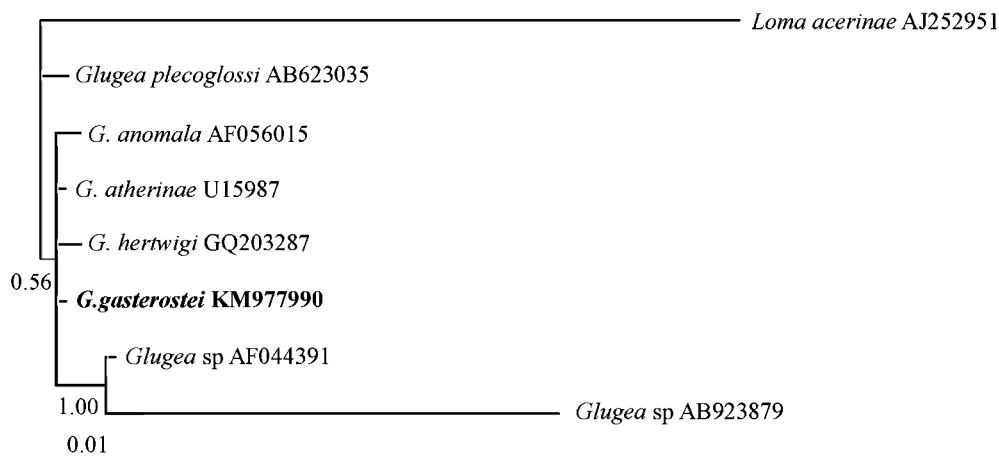


Рис. 5. Филограмма, построенная методом байесовского заключения в приложении MrBayes 3.1.2 на основании элайнмента нуклеотидных последовательностей участка гена мсрРНК, полученных в настоящей работе для *Glugea gasterostei* (выделено полужирным шрифтом) и загруженных из Генбанка.

Числа на развилках указывают значения постериорной вероятности. На масштабной линейке отмечено число ожидаемых замен на один нуклеотидный сайт. Аннотация таксонов включает номер доступа к использованному в работе сиквенсу, депонированному в Генбанке ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Fig. 5. A phylogram, obtained using Bayesian inference in MrBayes 3.1.2 software basing upon alignment of nucleotide sequences of SSU rRNA gene fragment obtained in the present study for *Glugea gasterostei* (bold font) and downloaded from Genbank.

по отношению друг к другу и к *Ichthyosporidium weissii* (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrink, 2005). В отношении видов рода *Glugea* в свое время была проведена ревизия и *G. americanus* из американского удильщика *Lophius americanus* на основании данных молекулярной филогении была переименована в *Spraguea americana*, т. е. отнесена к другому роду (Freeman et al., 2004). Остальные виды рода *Glugea*, сиквенсы гена мсрРНК которых депонированы в Генбанке, показывают уровень сходства, соответствующий представителям одного рода. Однако существенные возражения против отнесения к виду *G. anomala* возникают в отношении двух таксонов, сиквенсы гена мсрРНК которых депонированы под номерами AF04391 и AB923879. Дело в том, что *G. anomala* впервые описан из трехиглой колюшки фауны Франции (Moniez, 1887). Именно для такого изолята, хотя и значительно позже (Pomport-Castillon et al., 2000), получен сиквенс, депонированный под номером AF056015. Поскольку не имеется возможности провести сопоставление исходного (типового) образца данного вида с таковыми, изученными молекулярными методами, остается считать данный молекулярный гаплотип принадлежащим *G. anomala* на основании его географического происхождения. Другие гаплотипы, по-видимому, имеют иное происхождение (предположительно Норвегия для AF044391 и Индия для AB923879) и обладают достаточным уровнем дивергенции для отнесения к другим, еще не описанным видам.

Несмотря на низкий уровень дивергенции ряда видов рода *Glugea*, обусловленный высокой степенью родства рассматриваемых форм, самостоятельность таксона *G. gasterostei* по отношению к *G. anomala*, обоснован-

ная ранее на основании морфологических, ультраструктурных данных и гистотропии (Воронин, 1974; Воронин и др., 1997), подтверждается результатами анализа нуклеотидных последовательностей ДНК. Что касается всей группировки, включающей *G. gasterostei*, *G. atherinae*, *G. hertwigi* и *G. anomala*, высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей предполагает, что дивергенция этих таксонов произошла сравнительно недавно. В то же время сравнительный анализ морфологии спор и гистотропии одного вида микроспоридий, в частности *G. hertwigi*, из разных хозяев, собранных в разных географических точках, позволяет выявить значительные различия. Так, если у этого вида, паразитирующего у сямозерской корюшки *Osmerus eperlanus* в разных тканях, число витков полярной трубки в спорах колеблется в пределах 17—19 (Воронин и др., 1997), то у американской корюшки *Osmerus mordax* с Атлантического побережья Канады паразит развивается в подслизистом слое желудочно-кишечного тракта и клетках мезентерия, а число витков полярной трубки в спорах колеблется в пределах 12—13 (Lovy et al., 2009). В противоположность этому у *G. anomala* из девятииглой колюшки с Финского залива размеры спор и число витков полярной трубки (13—15) оказались практически сходными с таковыми (12—13) из трехиглой колюшки из Германии (Schmahl, Mehlhorn, 1989). Небольшая разница в числе витков полярной трубки (12 и 13—14), по данным разных авторов, отмечена и для разных изолятов вида *G. stephani*, средний размер спор которого составляет  $4.7 \times 2.7$  мкм (Canning, Lom, 1986). Вид *G. atherinae* сходен с *G. gasterostei* по локализации крупных ксеном в брюшной полости, морфологии и размерам спор ( $5.7 \times 2.9$  мкм). Однако число витков полярной трубки в спорах этой микроспоридии (12—17) варьирует в очень широких пределах (Berrebi, 1979). Близость четырех вышеуказанных видов по сходству нуклеотидных последовательностей не коррелирует ни с числом витков полярной трубки, ни с особенностями локализации паразитов в организме хозяина.

Таким образом, споры всех видов рода *Glugea* характеризуются единым образом своего строения, что также может свидетельствовать об эволюционно недавней дивергенции видов. Споры заключены в оболочку умеренной толщины, якорный диск небольшой и ацентриолярного расположения, поляропласт двухчастный из плотно и редко уложенных пластин, очень крупная задняя вакуоль, ядро, расположенное в центре споры. Ультраструктура полярной трубки, а именно число и строение слоев трубки на поперечном срезе у всех 5 изученных нами видов рода *Glugea* имеет большое сходство (Воронин и др., 1997). Основные видовые отличия микроспоридий рода *Glugea* заключены в размерах, форме и индексе спор, в числе витков полярной трубки, но главным образом в избирательности для своего развития определенного типа клеток, в гистотропии. По имеющимся у нас данным можно предположить, что процесс видообразования стимулировался либо успешным заражением и переходом на нового хозяина, либо переходом к развитию в клетках новой ткани, либо тем и другим одновременно. В этом отношении интересные данные может дать сравнение сиквенсов *G. hertwigi* из пресноводной сямозерской и американской корюшек, так как развитие микроспоридий происходит не только в разных хозяевах, но и в разных органах рыб.

О возможной эволюционной «молодости» микроспоридий рыб, и в частности рода *Glugea*, свидетельствуют данные экспериментов по изучению гостальной специфичности, когда круг хозяев определенного вида оказывался гораздо шире, чем это было известно по результатам классических полевых исследований. Так, спорами *G. hertwigi* из корюшек были заражены 2 из 4 подопытных трехиглых колюшек (Weissenberg, 1968). Положительный результат получен и при экспериментальном заражении радужной форели спорами *G. plecoglossi* из айю, но трехиглую колюшку при этом заразить не удалось (Takahashi, Egusa, 1977). Важно отметить, что при экспериментальном заражении разных видов колюшек и *G. gasterostei*, и *G. anomala* сохраняли локализацию в специфических для них микротопах — в клетках внутренних и внешних покровов соответственно (Воронин, 1983). Таким образом, развитие в клетках защитного ряда, располагающихся в мезентерии (брюшной полости), служит отличительным признаком для *G. gasterostei*, так же как и ряд морфометрических признаков спор. В свою очередь, основываясь только на молекулярных критериях, сложно определить грань между видами и внутривидовыми формами; однако, исходя из того, что каждый из этих видов имеет формальное описание, пересмотр их ранга (например, объединение рамками одного вида с выделением соответствующих подвидов) следует отложить до того времени, когда будет накоплен более репрезентативный набор данных для усовершенствования таксономии микроспоридий.

Примерно такой же уровень сходства нуклеотидных последовательностей (от 99.0 до 99.7 %) наблюдается у микроспоридий рода *Pleistophora* из рыб и ракообразных, например, между *P. typicalis* (AF044387), двумя изолятами *P. mulleri* (AJ438985 и FN434084) и *P. hippoglossoides* (AJ252953). Паразитов, представленных перечисленными сиквенсами, можно считать представителями не 3, а 4 филогенетических линий, достаточно дифференцированных генетически; т. е. один из изолятов *P. mulleri* потенциально представляет самостоятельный вид, нуждающийся в выявлении видовых критериев не только молекулярно-генетическими, но и всеми другими методами, используемыми в современной систематике микроспоридий (Токарев, 2013). Столь же невысокий уровень дивергенции отмечается и в других филогенетических группировках между таксонами, для которых обоснована принадлежность к отдельным видам, в частности в пределах родов *Tubulinosema* (Franzen et al., 2006; Malysh et al., 2013) и *Nosema* (Tokarev et al., 2015).

Постулировать принадлежность исследуемого изолята микроспоридий из рыб к определенному виду только на основании видовой принадлежности хозяина данного паразита не представляется корректным. Например, Лом (Lom, 2002) считает *G. gasterostei* синонимом *G. anomala* именно потому, что обе микроспоридии заражают колюшек, несмотря даже на то, что при первоописании были указаны четкие различия в морфометрических показателях представителей этих таксонов (Воронин, 1974), подкрепленные затем ультратонкими различиями в строении спор, а именно в числе витков полярной трубки (Воронин и др., 1997). С другой стороны, выявленные в настоящей работе тонкие молекулярно-генетические различия между *G. gasterostei* и *G. anomala* подкрепляются данными по сохранению гистотропной локализации каждым из этих паразитов при перекрестном заражении колюшек разных видов.

В любом случае очевидна необходимость привлечения методов ДНК-баркодинга для более точной идентификации и дифференциации изучаемых видов паразитов. При выявлении тонких различий в молекулярных гаплотипах возможно обоснование самостоятельных видов при условии получения дополнительных критериев вида. По-видимому, *G. gasterostei* и *G. anomala*, а также *G. hertwigi* и *G. atherinae* можно рассматривать как группу близкородственных видов, дивергенция которых произошла сравнительно недавно в эволюционной истории рода *Glugea* по сравнению с *G. plecoglossi*, а также *Glugea* sp. AF044391 и *Glugea* sp. AB923879, таксономический статус которых требует дальнейшего уточнения. В связи с низкой разрешимостью филогенетических реконструкций, основанных на последовательностях гена мсрРНК близкородственных видов *Glugea*, необходимо привлечение дополнительных локусов для исследования филогенетических отношений этих таксонов.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантами РФФИ (13-04-00693, 14-04-91176 и 14-04-31783) и грантом президента РФ МД-4284.2015.4.

#### Список литературы

- Воронин В. Н. 1974. Некоторые микроспоридии из колюшек Финского залива. Acta Protozoologica. 13: 212—220.
- Воронин В. Н. 1983. Микроспоридии рыб: биология и паразито-хозяйинные отношения. Паразитол. сб. Л.: Наука. 31: 144—157.
- Воронин В. Н., Исси И. В. 1974. О методиках работы с микроспоридиями. Паразитология. 8: 272—273.
- Воронин В. Н., Бурякина А. В., Колесникова И. Я., Тютин А. В. 1997. Сравнительная морфология спор микроспоридий рода *Glugea* из рыб России. Паразитология. 31: 260—264.
- Токарев Ю. С. 2013. Молекулярная филогения и паразитические свойства энтомопатогенных микроспоридий: Дис. ... д-ра биол. наук. СПб., Пушкин. 275 с.
- Berger P. 1979. Etude ultrastructurale de *Glugea atherinae* n. sp. microsporidie de l'atherinae, *Atherina boyeri* Risso, 1810 (Poisson, Teleosteen) dans les lagunes du Languedoc et de Provence. Zeitschrift für Parasitenkunde. 60: 105—122.
- Canning E. U., Lom J. 1986. The Microsporidia of Vertebrates. London, Academic Press Inc. 289 p.
- Diamant A., Goren M., Yokes M. B., Galil B. S., Klopman Y., Huchon D., Sztitenberg A., Karhan S. U. 2010. *Dasyatispora levantinae* gen. et sp. nov., a new microsporidian parasite from the common stingray *Dasyatis pastinaca* in the eastern Mediterranean. Diseases of Aquatic Organisms. 91: 137—150.
- Franzen C., Fischer S., Schroeder J., Schölmerich J., Schneuwly S. 2005. Morphological and molecular investigations of *Tubulinosema ratisbonensis* gen. nov., sp. nov. (Microsporidia: Tubulinosematidae fam. nov.), a parasite infecting a laboratory colony of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Journ. of Eukaryotic Microbiology. 52: 141—152.
- Freeman M. A., Yokoyama H., Ogawa K. 2004. A microsporidian parasite of the genus *Spraguea* in the nervous tissues of the Japanese anglerfish *Lophius litulon*. Folia Parasitologica. 51: 167—176.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95—98.

- Lom J. 2002. A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Systematic Parasitology*. 53: 81—99.
- Lovy J., Kostka M., Dykova I., Arsenault G., Peckova H., Wright G. M., Speare D. J. 2009. Phylogeny and morphology of *Glugea hertwigi* from rainbow smelt *Osmorus mordax* found in Prince Edwards Island, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*. 86: 235—243.
- Malysh J. M., Tokarev Y. S., Sitnicova N. V., Martemyanov V. V., Frolov A. N., Issi I. V. 2013. *Tubulinosema loxostegi* sp. n. (Microsporidia: Tubulinosematidae) from the beet webworm *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Crambidae) in Western Siberia. *Acta Protozoologica*. 52: 299—308.
- Olson R. E. 1981. Effects of low temperature on the development of the microsporidian *Glugea stephani* in English sole (*Parophrys vetulus*). *Journ. of Wildlife Diseases*. 17: 559—562.
- Pomport-Castillon C., Jonckheere J. F., Romestand B. 2000. Ribosomal DNA sequences of *Glugea anomala*, *G. stephani*, *G. americanus* and *Spraguea lophii* (Microsporidia): phylogenetic reconstruction. *Diseases of Aquatic Organisms*. 40: 125—129.
- Ronquist F., Huelsenbeck J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572—1574.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schmahl G., Mehlhom H. 1989. Treatment of fish parasites. G. Effect of sym. Triazinone (Toltrazuril) on developmental stage of *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia): A light and electron microscopic study. *European Journ. of Protistology*. 24: 252—259.
- Takahashi S., Egusa S. 1977. Studies on *Glugea* infection of the ayu, *Plecoglossus altivelis*. I. Description of the *Glugea* and a proposal of a new species *Glugea plecoglossi*. *Japanese Journ. of Fisheries*. 11: 175—182.
- Tokarev Y. S., Malysh J. M., Kononchuk A. G., Seliverstova E. V., Frolov A. N., Issi I. V. 2015. Redefinition of *Nosema pyrausta* (*Perezia pyraustae* Paillot 1927) basing upon ultrastructural and molecular phylogenetic studies. *Parasitology Research*. 114: 759—761.
- Vogelstein B., Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 76: 615—619.
- Vossbrinck C. R., Debrunner-Vossbrinck B. A. 2005. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitologica*. 52: 131—142.
- Weiss L. M., Vossbrinck C. R. 1999. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the Microsporidia. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, ASM Press. 129—171.
- Weissenberg R. 1968. Intracellular development of the microsporidian *Glugea anomala* Moniez in hypertrophying migratory cells of the fish *Gasterosteus aculeatus*, an example of the formation of the xenoma tumors. *Journ. of Protozoology*. 15: 44—57.

THE MICROSPORIDIUM *GLUGEA GASTEROSTEI* VORONIN 1974  
(MICROSPORIDIA: MARINOSPORIDIA) FROM THE THREE-SPINED  
STICKLEBACK *GASTEROSTEUS ACULEATUS* (ACTINOPTERYGII:  
GASTEROSTEIFORMES) AS AN INDEPENDENT SPECIES

© Y. S. Tokarev, V. N. Voronin, I. V. Senderskiy, I. V. Issi

*Key words:* microsporidia, phylogeny, speciation, taxonomy, ribosomal RNA.

SUMMARY

The microsporidium *Glugea gasterostei* from the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* was described as an independent species basing upon morphological and ecological traits of the parasite (Voronin, 1974), further supported by ultrastructural characters of its spores (Voronin, 1983). During the revision of microsporidia of the genus *Glugea* (Canning, Lom, 1986; Lom, 2002), the validity of this species was doubted and it was synonymized with *G. anomala*. Nevertheless, the molecular phylogenetic analysis performed in the present study showed the unique molecular haplotype of small subunit rRNA gene of *G. gasterostei* (Genbank accession number KM977990) and its close relatedness to *G. anomala*, *G. atherinae* and *G. hertwigi* (sequence similarity of 99.7 %). One of typical characters of *G. gasterostei*, as opposed to *G. anomala*, is the formation of xenomas on inner tissues and not on the surface of infected fishes. This feature is retained even after the infection of different host species. Taken together, these data confirm the validity of *G. gasterostei* as a separate species among closely related taxa that had diverged comparatively recently.

---